Aus dem Anatomischen Institut der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
Lehrstuhl I: Prof.Dr. K. UNSICKER

ULTRAMORPHOLOGISCHE, HISTO- UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG ADRENALER CHROMAFFINER ZELLEN DES MEERSCHWEINCHENS IN TRANSPLANTATEN IN DIE VORDERE AUGENKAMMER UND IN DER GEWEBEKULTUR

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

BARBARA TSCHECHNE

aus Dülken

Marburg 1978

Aus dem Anatomischen Institut der Philipps-Universität
Marburg/Lahn
Lehrstuhl I: Prof.Dr. K. UNSICKER

ULTRAMORPHOLOGISCHE, HISTO- UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG ADRENALER CHROMAFFINER ZELLEN DES MEERSCHWEINCHENS IN TRANSPLANTATEN IN DIE VORDERE AUGENKAMMER UND IN DER GEWEBEKULTUR

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

BARBARA TSCHECHNE

aus Dülken

Marburg 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 15.12.1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. K. Unsicker
Correferent: Prof. Dr. med. dent. Bernhardt

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	5
A. Untersuchungen an Augenkammertransplantaten	5
B. Gewebekulturen	6
C. Biochemische Bestimmungen von Adrenalin, Noradrenalin und Phenyläthanolamin N-methyltransferase	7
D. Statistik	8
E. Verwendete Substanzen	9
3. BEFUNDE	1o
A. Kontrollen	1o
B. Augenkammertransplantate	15
C. Gewebekulturen	24
4. DISKUSSION	29
5. ZUSAMMENFASSUNG	36
6. LITERATURVERZEICHNIS	38

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546006_0076

1. EINLEITUNG

Das Nebennierenmark (NNM) ist ein modifiziertes sympathisches Ganglion, das spezialisiert ist auf die Synthese und Freisetzung der Catecholamine (CA) Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA). Die endokrinen Zellen des NNM, wegen ihrer Affinität zu Chromsalzen auch chromaffine Zellen genannt, haben außer ihrer Fähigkeit, NA zu bilden, mit sympathischen adrenergen Neuronen eine Reihe weiterer Eigentümlichkeiten gemeinsam: Sie entstammen der Neuralleiste (Weston, 197o), werden von präganglionären, cholinergen Axonen innerviert (Feldberg et al., 1934; Coupland, 1965), verfügen über identische Träger- und Enzymproteine (v. Euler, 1972; Stjärne, 1972) und benötigen Calcium zur Sekretion von CA (Douglas, 1968; Smith und Winkler, 1972). Andererseits haben chromaffine Zellen und sympathische adrenerge Neurone auch einige verschiedene morphologische, physiologische und pharmakologische Eigenschaften: Adrenale chromaffine Zellen synthetisieren außer NA auch A; sie bilden in der Regel keine Fortsätze und sind damit ungeeignet zur Erregungsleitung; sie werden durch 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), Guanethidin und Immunosympathektomie mit einem Nerve growth factor Antiserum nicht zerstört (Cheah et al., 1971; Burnstock et al., 1971; Levi-Montalcini und Angeletti, 1966).

Noch weitgehend unbekannt sind die genetischen, humoralen oder sonstigen Faktoren, welche zur Differenzierung[1] von chromaffinen Zellen und sympathischen adrenergen Neuronen führen und diese Differenzierung zeitlebens erhalten (vgl. Burnstock und Costa, 1975, pp 1o7-136; Hendry, 1976):

Nerve growth factor (NGF), ein insulinähnliches Protein, das während der Embryonalentwicklung, möglicherweise auch

---

[1] Als differenziert werden im folgenden chromaffine Zellen bezeichnet, wenn sie in Struktur und Leistung den chromaffinen Zellen im NNM des adulten Tieres gleichen.

nachgeburtlich, in verschiedenen Organen produziert wird (Levi-Montalcini und Angeletti, 1968), ist als trophische Substanz, welche das Auswachsen von Fortsätzen stimuliert und die beiden Schlüsselenzyme der NA-Synthese Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin ß-hydroxylase (DBH) induziert, von entscheidender Bedeutung für die normale Entwicklung sympathischer adrenerger Neurone (Hendry, 1976).
Ob NGF auch für die Differenzierung der chromaffinen Zellen notwendig ist, wird noch diskutiert (vgl. Unsicker et al., 1978d).

Zahlreiche experimentelle Befunde sprechen für eine Beeinflussung des für die Synthese von A erforderlichen Enzyms Phenyläthanolamin N-methyltransferase (PNMT) durch Glucocorticoide (Wurtmann und Axelrod, 1966; Pohorecky und Wurtman, 1971), die in der Nebennierenrinde gebildet werden. Glucocorticoide sind jedoch möglicherweise nicht die einzigen Faktoren aus der unmittelbaren Umgebung des NNM, welche für die A-Synthese erforderlich sind. Unsicker et al. (1978d) haben kürzlich gezeigt, daß sich die in Zellkulturen von Ratten-NNM zu beobachtende Verschiebung der proportionalen Anteile von A- und NA-Zellen zugunsten der letzteren nicht durch Gaben von Dexamethason verhindern läßt.

Für die Determination des Transmitters in Neuronen des peripheren autonomen Nervensystems spielen nicht-neuronale Zellen (Mesenchym, Glia) eine entscheidende Rolle (Zusammenfassung bei Patterson, 1978). Isolierte Neurone aus sympathischen Ganglien entwickeln in vitro die Eigenschaften, die man von adrenergen Neuronen erwartet: Sie synthetisieren NA aus Tyrosin (Mains und Patterson, 1973) und speichern und sezernieren exogen appliziertes NA (O'Lague et al., 1975; Patterson et al., 1975).

In der Gegenwart nicht-neuronaler Zellen dagegen synthetisieren diese Neurone Acetylcholin (ACH) und zeigen hohe Aktivitäten des synthetisierenden Enzyms Cholinacetyltransferase (CAT) (Patterson und Chun, 1974). Über eine mögliche Rolle, die nicht-neuronale Zellen für die Determinierung der Transmitterfunktion in chromaffinen Zellen spielen könnten, ist bisher nichts bekannt.

Über die Bedeutung der präganglionären cholinergen Innervation für die Differenzierung chromaffiner Zellen weiß man, daß sie die Aktivität der TH in sympathischen Ganglien und NNM regelt (Thoenen, 1974). Möglicherweise spielt die neuronale Aktivität auch eine Rolle für die Determination eines bestimmten Transmitters in sympathischen adrenergen Neuronen in vitro: Walicke et al. (1977) konnten zeigen, daß Depolarisierung die Synthese von ACH unterdrückt.

Untersuchungen in Zellkulturen, die eine weitgehende Manipulation des Milieus ermöglichen, und Verpflanzungen von NNM an geeignete Transplantationsorte (z.B. Nierenkapsel, vordere Augenkammer) sind Versuchsansätze, die zur weiteren Analyse der Faktoren beitragen können, welche für die Differenzierung der chromaffinen Zellen wichtig sind.

In Gewebe- bzw. Zellkulturstudien haben Unsicker und Chamley (1977) gezeigt, daß chromaffine Zellen von 8-14 Tagen alten Ratten nach 7 bzw. 14 Tagen in vitro weitgehend den kleingranulären Zellen gleichen, die in zahlreichen sympathischen Ganglien beschrieben worden sind (Matthews und Raisman, 1969; Williams und Palay, 1969). Sie speichern überwiegend primäre biogene Amine anstelle des im NNM in vivo dominierenden sekundären Amins A, bilden Fortsätze und gehen synapsen-ähnliche

Kontakte untereinander ein. Die Bildung von Fortsätzen kann mit Hilfe von NGF stimuliert (Unsicker et al., 1978b, d) und durch dbcAMP plus Theophyllin (Unsicker und Chamley, 1976) oder Dexamethason (Unsicker et al., 1978d) gehemmt werden.

Unter die Nierenkapsel transplantierte adrenale chromaffine Zellen adulter Meerschweinchen, die wie in vitro gehaltene Zellen dem Einfluß hoher Corticosteroiddosen entzogen sind und keine präganglionäre Innervation mehr besitzen, zeigen eine ähnliche neuronale Transformation, enthalten allerdings überwiegend Speichergranula vom A-Typ (Unsicker et al., 1977a).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Ultramorphologie, CA-Histo- und Biochemie von adrenalen chromaffinen Zellen in der vorderen Augenkammer des Meerschweinchens und soll die im Anatomischen Institut Kiel seit 1976 durchgeführten Untersuchungen über chromaffine Zellen in vitro und in Transplantaten unter der Nierenkapsel ergänzen. Nierenkapsel und vordere Augenkammer unterscheiden sich erheblich in Ausmaß und Qualität ihrer efferenten Innervation. Die Nierenkapsel ist äußerst spärlich von adrenergen Nerven versorgt; Transplantate von NNM unter die Kapsel werden nicht reinnerviert (Carruba et al., 1974; Unsicker et al., 1977a). Dagegen besitzt die vordere Augenkammer mit der Iris ein dicht adrenerg und cholinerg innerviertes Organ. Nachdem D. Tschechne (in Vorbereitung) zeigen konnte, daß chromaffine Zellen in der vorderen Augenkammer reinnerviert werden, ergab sich die Möglichkeit, die Struktur dieser Zellen mit der von nicht reinnervierten chromaffinen Zellen in vitro und unter der Nierenkapsel zu vergleichen, um festzustellen, welche Bedeutung eine intakte Innervation und eine reich innervierte, aber im Vergleich zum Nebennierenmark glucocorticoid-arme Umgebung für die Differenzierung adulter chromaffiner Zellen besitzen.

2. MATERIAL UND METHODE

A. Untersuchungen an Augenkammertransplantaten wurden bei 17 adulten, 35o - 65o g schweren weiblichen Albino-Meerschweinchen eines Inzuchtstammes durchgeführt. Die Tiere wurden mit Ketanest^{R} (3 ml/kg) und Äther anästhesiert, die linke Nebenniere durch einen Flankenschnitt dargestellt und nach Abklemmen der zuführenden Gefäße steril entfernt. Unter einem Binokular-Mikroskop wurden Mark- und Rindenteile sorgfältig getrennt und das Mark in kleinen Stücken in die durch einen Schnitt am Limbus corneae eröffnete vordere Augenkammer des linken Auges transplantiert.

Die Revaskularisierung der Transplantate wurde zwei Tage post operationem mit Hilfe einer Spaltlampe überprüft. 8 Tieren wurde 4-8 Tage vor der Transplantation das linke Ganglion cervicale superius entfernt, um die homolaterale Iris sympathisch zu denervieren. 4, 8 oder 12 Wochen nach der Transplantation wurden die Versuchstiere über die Aorta descendens retrograd mit 2oo ml einer eiskalten, 3,5 %igen phosphatgepufferten (o,1 M) Glutaraldehydlösung perfundiert. Rechtes und linkes Auge wurden entfernt und die vorderen Bulbushälften in kleinen Stücken für 1 Stunde bei 4^{o} C im Glutaraldehyd-Phosphatpuffergemisch belassen. Anschließend wurden die Stücke in mehrmals gewechseltem Phosphatpuffer gespült, in 2 % wässrigem OsO_4 2 Stunden nachfixiert und in einer aufsteigenden Äthanolreihe entwässert. Die Einbettung erfolgte über Propylenoxid in Araldit.

1 µm dicke, der lichtmikroskopischen Orientierung dienende und mit Azur II-Methylenblau gefärbte (Richardson et al., 196o) Dickschnitte sowie 5o-7o nm dicke Dünnschnitte wurden an einem Reichert Ultramikrotom OmU_2 angefertigt, Dünnschnitte wurden

je 5 Minuten mit gesättigter Uranylacetat-(in 7o % Methanol) und Bleicitratlösung (Reynolds, 1963) kontrastiert und in den Elektronenmikroskopen Zeiss EM 9 A (6o kV) und Siemens 1o1 (8o kV) untersucht.
Nicht transplantierte Nebennieren wurden als Kontrollen verwendet und, wie oben beschrieben, fixiert und eingebettet.

Zum Nachweis von NA in chromaffinen Zellen wurde an Araldit-Dickschnitten von Kontroll- und Transplantatgewebe die Argentaffine Reaktion (Singh, 1964; Gorgas und Böck, 1976) durchgeführt Die Methode erlaubt den Nachweis von NA, das mit Glutaraldehyd einen unlöslichen Niederschlag bildet (Hopwood, 1971).
A und unkontrollierbare Mengen von Dopamin (DA) gehen während der Fixierung verloren und können deshalb mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.
Zum Nachweis der CA-Histofluoreszenz in Kontrollen von NNM und Iris (vor und nach Sympathektomie) sowie in transplantierten Medullae, die auf der Irisunterlage als Häutchenpräparat verarbeitet wurden, diente die Glyoxylsäure-Methode (Furness und Costa, 1975; de la Torre und Surgeon, 1976).

B. In Gewebekulturen wurden Explantate von NNM neugeborener Meerschweinchen untersucht, die bis zu 14 Tagen in vitro gehalten wurden. Nach steriler Entnahme der Nebennieren wurden Mark und Rinde sorgfältig getrennt und kleine Stücke von NNM 1o-2o min in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) mit 1 % Collagenase (Worthington, 136 U/mg) bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Stücke in HBSS gewaschen, auf collagenbeschichtete Deckgläser explantiert und in modifizierten Gewebekulturkammern nach Rose unter einem Streifen Dialyse-

Cellophan bei 37° C gehalten. Als Medium diente M 199 unter Zusatz von 2o % fetalem Kälberserum, Glucose, Glutamin, Gentamycin und Phenolrot als Indikator (Einzelheiten bei Chamley et al., 1972). Zweimal wöchentlich wurde das Medium ausgetauscht. Die Begasung der Kammern erfolgte durch das im Inkubator vorhandene Luft-O_2 und durch CO_2, dessen Zufuhr in Abhängigkeit vom pH des Mediums geregelt wurde.
Die Kulturen wurden täglich im Phasenkontrastmikroskop untersucht und nach 7 bzw. 14 Tagen für die Elektronenmikroskopie (s.o.) aufbereitet. 4 der insgesamt 16 untersuchten Kulturen erhielten vom zweiten Tag an 1o ng/ml NGF.

C. Bestimmungen von A, NA und PNMT wurden an den die Transplantate enthaltenen Augen von 17 Versuchstieren durchgeführt, denen das homolaterale Ganglion cervicale superius entfernt worden war. Bei 5 Tieren wurde zur Kontrolle keine Transplantation in das linke Auge vorgenommen. Zum Vergleich wurden auch die rechten Augen (mit intakter sympathischer Innervation) sowie intakte Nebennieren in die Untersuchung mit einbezogen. Die Augen bzw. Organe wurden in 6 ml 5mM Tris-HCl Puffer (pH 7,o), der o,2 % Triton X-1oo und o,2 % Rinderserum-Albumin enthielt, homogenisiert. Zur Beurteilung der PNMT-Aktivität und der CA wurde das Homogenat in zwei Teile geteilt.
Zur PNMT-Aktivitätsmessung wurde die leicht modifizierte Methode nach Axelrod (1962) benutzt. Das Homogenat wurde 3o min. bei 2o.ooo U/min in einer Sorvall Superspeed RC2-B Zentrifuge zentrifugiert. 2o µl der überstehenden Flüssigkeit wurden für 5 Min. bei 37° C in einem Gesamtvolumen von 2oo µl inkubiert, das 8o µl 5 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,o), 5o µl 1N Tris-HCl Puffer (pH 8,6), 1,8 mM Phenyläthanolamin (gelöst in 25 µl o,oo1 N HCl), 2o µl o,oo1

N HCl und 5 µl S-Adenosylmethionin-Lösung (total o,7 nmol, 17 % ^{14}C-markiert, spezifische Aktivität 56,7 mCi nmol^{-1}) enthielt. Während der Inkubationsdauer war die anfängliche Rate der Enzymaktivität konstant. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 5oo µl Borat-Puffer (pH 1o,o) gestoppt. Die Leerwerte wurden durch die Hinzufügung von S-Adenosyl-Methionin und Borat-Puffer hergestellt. Das ^{14}C-markierte N-methylierte Reaktionsprodukt wurde in 6 µl 97 % Toluen-3 % Isoamylalkohol (v/v) extrahiert, das der Reaktionsmischung beigegeben wurde. Das Röhrchen wurde 5 min. geschüttelt und zentrifugiert. Ein Rest von 4 ml des organischen Lösungsmittels wurde für die Flüssigscintillations-Zählung (Packard Modell 338o) nach Zugabe von 1o ml Scintillations-Flüssigkeit benutzt. NA und A wurden aus 2 ml des Homogenates durch Hinzufügen von 2 ml 1o % Trichloracetatsäure für 2o min. bei 4° C extrahiert. Nach Zentrifugierung mit 5ooo U/min bei 4° C für 1o min. wurde das Sediment mit 6 ml 5 % Trichloracetatsäure extrahiert und wie oben beschrieben zentrifugiert.
Die Überstände wurden abgehoben, und die CA zu gleichen Teilen an Aluminium adsorbiert und eluiert. NA und A wurden durch eine Differential-Fluorometrie gemessen (Unsicker et al. 1977b).

D. Statistik. Zur Erstellung der Histogramme (Abb.17) wurden die Durchmesser der "cores" der Speichervesikel in A-Zellen von Kontrollen und in Transplantaten 4, 8 und 12 Wochen nach der Operation mit Hilfe des Zeiss TGZ bestimmt. In jeder Gruppe wurden mindestens 2.ooo Granula gemessen. Die biochemischen Ergebnisse wurden durch ein gebräuchliches Meßverfahren (T-Test) geprüft und statistisch gesichert. Soweit nicht anders vermerkt, wurde für alle angeführten Meßwerte eine Irrtumswahrscheinlichkeit innerhalb von 5 % ermittelt.

E. Benutzte Substanzen: Phenyläthanolamin (ICN), S-Adenosyl-Methionin (Boehringer Mannheim), ^{14}C-S-Adenosyl-Methionin, NEN, Dreieichenhain).

M 199, Fetales Kälberserum, HBSS, Bicarbonat, Glutamin, Gentamycin, Phenolrot (alle Flow Laboratories, Bonn), 5- und 6-OHDA-hydrochlorid (Labkemi, Schweden).

2.5S-NGF aus den Submaxillaris-Drüsen männlicher Mäuse war ein großzügiges Geschenk von PD Dr. U. Otten, Biozentrum der Universität Basel.

3. BEFUNDE

A. Kontrollen

Die elektronenoptischen Beobachtungen am NNM adulter weiblicher Meerschweinchen deckten sich mit den von Habura-Flüh, Unsicker und Zwarg mitgeteilten Befunden (Habura-Flüh, in Vorbereitung; Unsicker et al., 1978a). A-Zellen (Abb. 1, 2) machten mit 85-9o % den Hauptanteil der adrenalen chromaffinen Zellen aus, NA-Zellen gehörten zum überwiegenden Teil zum kleingranulären Typ (vgl. Unsicker et al., 1978a). Nervenzellen wurden regelmäßig gefunden. Chromaffine und Nerven-Zellen waren mit Schwannzellen assoziiert, die eine lückenhafte Hülle um die endokrinen und einen geschlossenen Mantel um die Nervenzellen bilden. Auffälligstes Zellorganell der chromaffinen Zellen waren die spezifischen Speichervesikel, die in A-Zellen "cores" geringer, in NA-Zellen dagegen solche hoher Elektronendichte aufweisen. Zellen, die Speichervesikel beider CA-Sorten enthielten, wurden nicht mit Sicherheit identifiziert. Die Durchmesser der "cores" der A-Zellen sind aus dem Histogramm (Abb. 17) zu ersehen; der mittlere Durchmesser betrug ca. 17o nm. Profile von rauhem endoplasmatischen Retikulum (ER) waren einzeln oder als kleine Inseln in allen chromaffinen Zellen zu beobachten. Golgi-Apparat und Mitochondrien waren unauffällig. Benachbarte chromaffine Zellen trennte ein 15-2o nm Interzellularspalt; Desmosomen waren die einzigen spezifischen Haftstrukturen, die solche Zellen miteinander verbanden.
Ultrastrukturelle Hinweise auf eine Aufnahme von i.p. injiziertem 5- oder 6-OHDA in chromaffine Zellen ergaben sich nicht. Schnitte von Nebennieren, die nach der Glyoxylsäure-Methode behandelt worden waren, zeigten eine intensive gelb-grün-Fluoreszenz der

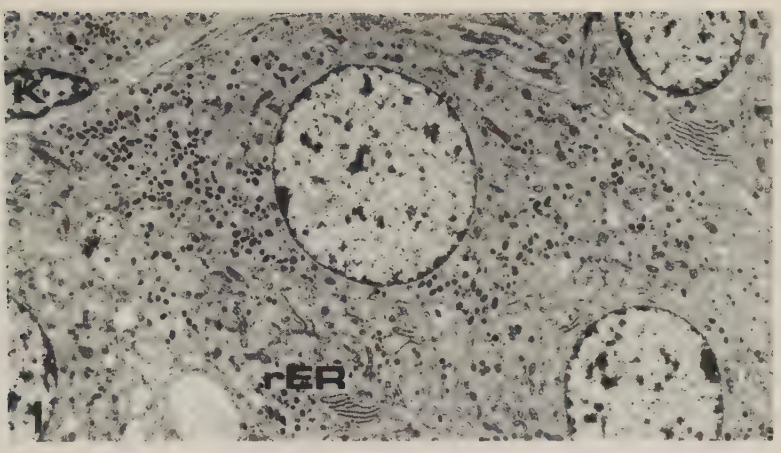


Abb. 1: Chromaffine Zellen im Nebennierenmark des adulten Meerschweinchens. Die Zellen enthalten Speichergranula vom A-Typ und einige Inseln von rauhem ER (rER). Kern einer Schwannzelle (K). x 5.4oo.

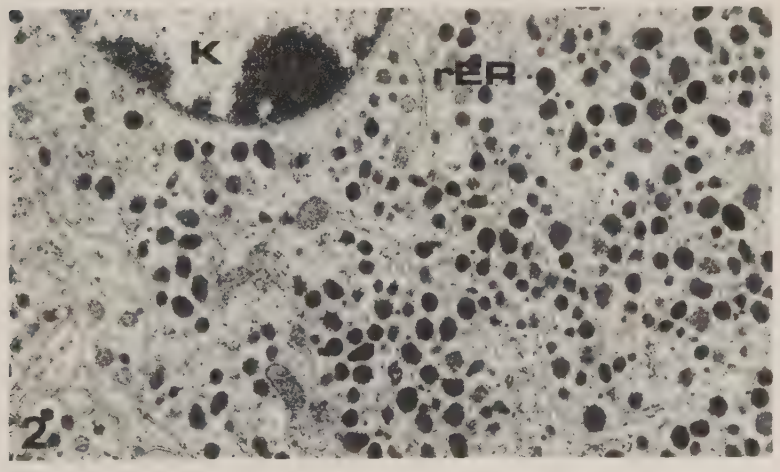
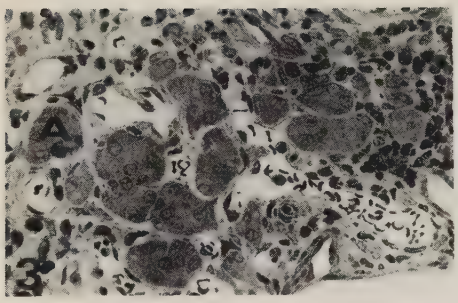


Abb. 2: Chromaffine Zellen im Nebennierenmark des adulten Meerschweinchens. Vesikel enthalten Kerne von geringer bis mittlerer Elektronendichte als Ausdruck der Speicherung von A. Einzelne Profile von rauhem ER (rER) sind locker verteilt. Zellkern (K). x 18.ooo.



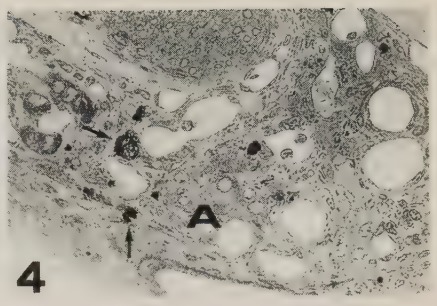


Abb. 3: Intakte adrenale chromaffine Zellen (A) in reich vaskularisiertem lockerem Bindegewebe 4 Wochen nach Transplantation in die vordere Augenkammer. Semidünnschnitt, Färbung mit Azur II-Methylenblau. x 125.

Abb. 4: Transplantierte chromaffine Zellen (A). Negativer Ausfall der argentaffinen Reaktion als Hinweis auf das Nicht-Vorkommen eines primären biogenen Amins (NA bzw. Dopamin). Mastzellen zeigen eine positive argentaffine Reaktion (Pfeile). x 125.

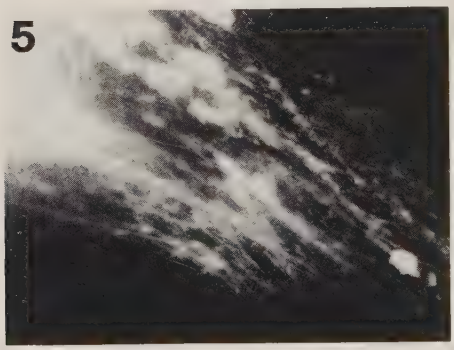


Abb. 5: Fluoreszierende Catecholamin-haltige chromaffine Zellen und Fortsätze in einem Häutchenpräparat der Iris nach Transplantation von NNM in die vordere Augenkammer und Entfernung des ipsilateralen Ganglion cervicale superius. Glyoxylsäure-Methode zur Darstellung von CA. x 5o.

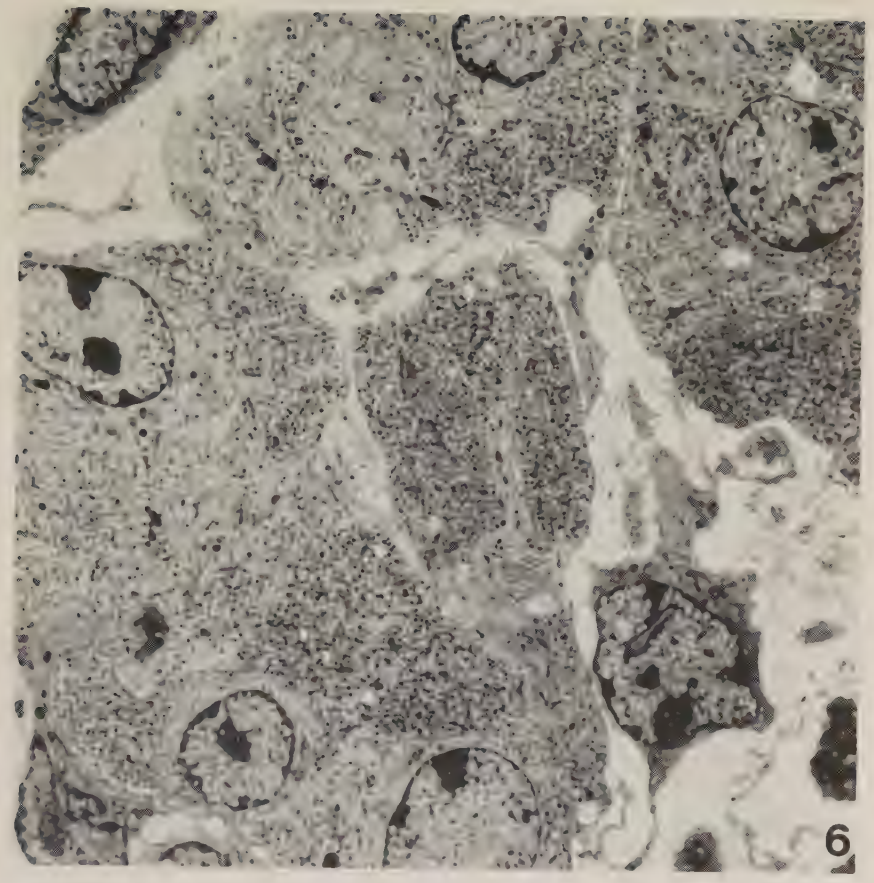


Abb. 6: Gruppe von adrenalen chromaffinen Zellen 4 Wochen nach der Transplantation in der vorderen Augenkammer des adulten Meerschweinchens. Die Zellen zeigen die gleichen typischen "chromaffinen" Granulärvesikel wie im Nebennierenmark in situ (vgl. Abb. 1 und 2). Beachte die unterschiedlichen Mengen von Speichervesikeln in verschiedenen Zellen. x 5.400.

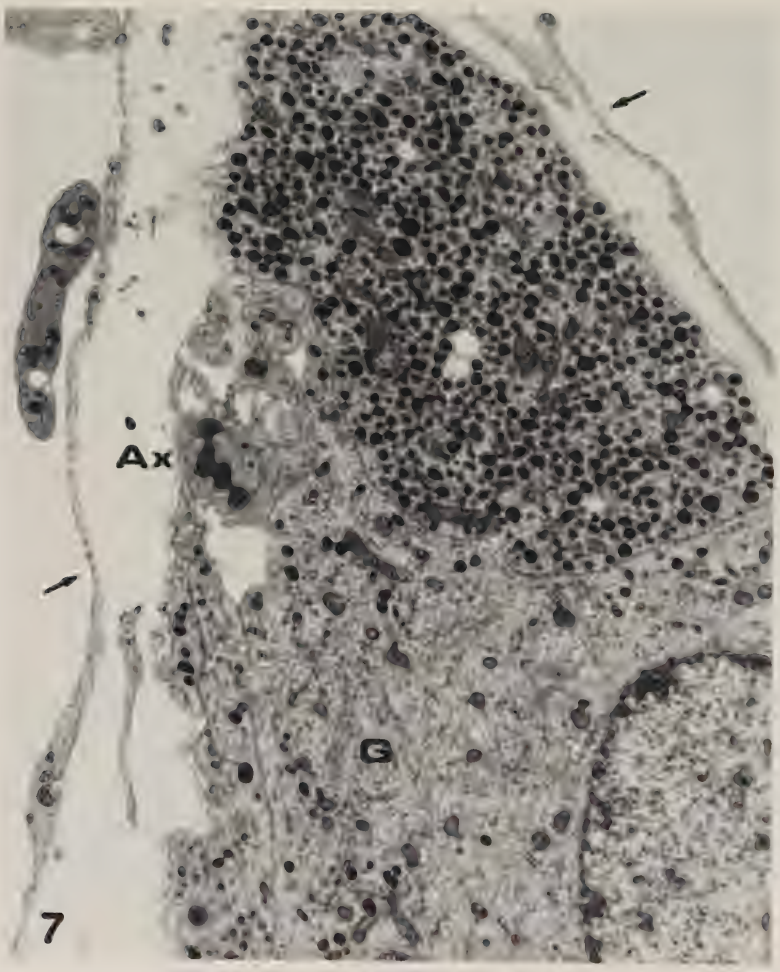


Abb. 7: Adrenale chromaffine Zellen 4 Wochen nach der Transplantation. In einer der Zellen ist ein sehr gut entwickelter Golgikomplex (G) getroffen, in dessen Bereich nur wenige Speichervesikel liegen. Gefenstertes Endothel einer Kapillare (Pfeile). Axon mit kleinen hellen Vesikeln (Ax). x 18.000.

chromaffinen Zellen. (Abb. 5)
Die Ergebnisse der quantitativen CA- und PNMT-Bestimmungen sind der Tab. 1 zu entnehmen. Diese Ergebnisse bestätigten den in den morphologischen Untersuchungen bereits festgestellten hohen proportionalen Anteil von A.

B. Augenkammertransplantate

a. nach 4 Wochen

Untersuchungen an Semidünnschnitten ergaben, daß die Transplantate frei von Nekrosen und reichlich vaskularisiert waren. Die Transplantate zeigten die vom NNM in situ her bekannte Anordnung in Zellballen, die jedoch vor allem in der Peripherie durch einsprossendes Bindegewebe aufgelockert waren (Abb. 3).
Der ausgezeichnete Erhaltungszustand der Zellen wurde elektronenoptisch bestätigt. Zwischen 3 und 1o chromaffine Zellen bildeten kompakte Gruppen, die von einer gemeinsamen Basallamina umgeben waren (Abb. 6). Auch einzeln liegende chromaffine Zellen waren gegenüber dem Bindegewebe durch eine Basallamina abgegrenzt. Transplantierte chromaffine Zellen zeigten im Wesentlichen die von den Kontrollen her bekannten feinstrukturellen Details. Sie enthielten die spezifischen CA-Speichervesikel, unauffällige Golgi-Areale, vereinzelt Lysosomen und Mitochondrien vom Crista-Typ. Das rauhe ER erschien nicht vermehrt. Auffällig war, daß die Menge an Speichervesikeln von Zelle zu Zelle erheblich schwankte und die Elektronendichte der "cores" in ein und derselben Zelle mitunter stark variierte (Abb. 7). Die Klassifizierung mancher Zellen als A- bzw. NA-speichernd war deshalb nicht möglich. Allerdings gehörte die überwiegende Mehrzahl der Zellen, wie in Kontrollen, eindeutig dem A-Typ an; reine NA-Produzenten wurden nicht gefunden. NA konnte auch histochemisch mit der Argentaffin-Methode nicht nachgewiesen werden (Abb. 4).

Die Durchmesser der "cores" in Speichervesikeln schwankten zwischen 7o und 2oo nm; im Durchschnitt waren sie kleiner als in Kontrollen (Abb. 17).

Im Gegensatz zu chromaffinen Zellen im NNM in situ wiesen zahlreiche Zellen eine elongierte Form auf und bildeten Fortsätze, die sich in der Art adrenerger Nerven in der Iris ausbreiteten (Abb. 5). Eine ausführliche Darstellung dieser Fortsätze sowie der synaptischen und synaptoiden Kontakte an transplantierten chromaffinen Zellen wird an anderer Stelle gegeben (D. Tschechne, in Vorbereitung; Unsicker et al., 1978b, c).

Biochemische Analysen von Augen (Tab. 1), die sympathisch denerviert waren und Transplantate enthielten, zeigten, daß A wie im NNM in situ das dominierende CA war, obwohl die PNMT-Aktivität drastisch abgesunken war.

Die absoluten Mengen von A und NA waren gegenüber Kontrollen erheblich vermindert. Der NA-Gehalt unterschied sich nicht signifikant vom NA-Wert sympathektomierter Augen, eine Bestätigung für die Richtigkeit unseres morphologischen Befundes, wonach Zellen vom NA-Typ in den Transplantaten fehlten.

Schwannzellen zeigten das von den Kontrollen her bekannte ultramorphologische Bild. Die Kapillaren im Bereich der Transplantate waren wie im NNM in situ und im Gegensatz zu Kapillaren in anderen Bereichen der Iris gefenstert (Abb. 7).

Nur in einem Transplantat wurden einige adrenocorticale Zellen gefunden. In einigen Transplantaten beobachteten wir vereinzelt Nervenzellen (Abb. 8) mit großen, chromatinarmen Kernen, Nissl-Schollen und Mitochondrien vom Crista-Typ, die auch normalerweise im NNM vom Meerschweinchen vorkommen (Unsicker et al., 1978a). An den Zellkörpern und Dendriten endeten cholinerge Axone als Synapsen (Abb. 8; s. auch D. Tschechne, in Vorbereitung).

Chromaffine Zellen in Transplantaten, die in sympathisch denervierte

Tab. 1: Quantitative Bestimmungen von A, NA und PNMT-Aktivität in Nebennieren adulter weiblicher Meerschweinchen in Transplantaten

	Versuchsgruppen	NA (µg/Drüse)	A (µg/Drüse) (% d. Summe A + NA)	PNMT-Aktivit. $nMol\ min^{-1}$/ Drüse	NA (ng/Auge)	A (ng/Auge)	PNMT-Aktivität ($pMol.\ min^{-1}$/ Auge)
I	Kontrollen (n = 5) (linke Nebennieren)	$0,84 \pm 0,28$	12 ± 2 94 ± 2 %	$0,9 \pm 0,1$			
II	Kontrollen (n = 6) rechte, innervierte Augen				77 ± 15	unterhalb d. Nachweis-grenze	$6,3 \pm 0,2$
III	Kontrollen (n = 5) linke Augen, 4 Wo. nach Sympathektomie, kein Transplantat enthaltend				26 ± 13	10 ± 13	$4,3 \pm 0,4$
IV	linke Augen (n = 6) sympathektomierter Tiere, 4 Wochen nach Einpflanzung der Transplantate				37 ± 25	228 ± 54	$5,9 \pm 1,1$
V	linke Augen (n = 6) sympathektomierter Tiere, 8 Wochen nach Einpflanzung der Transplantate				125 ± 20	178 ± 57	$6,0 \pm 0,5$

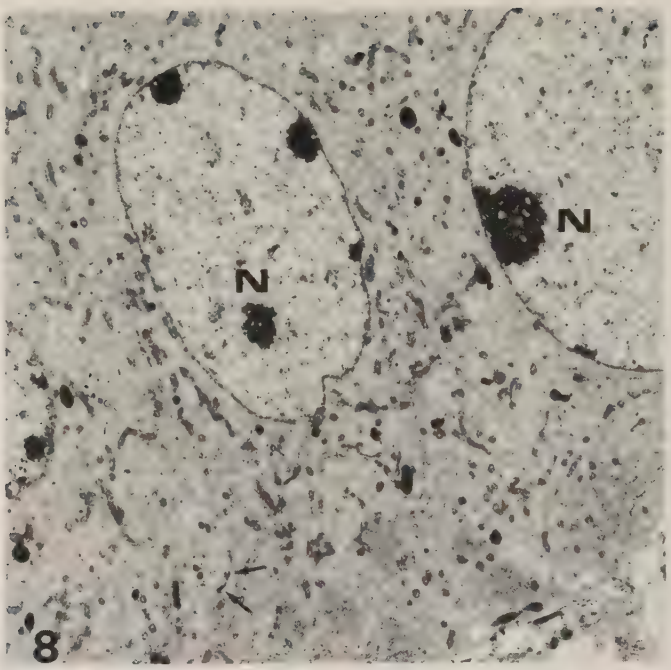
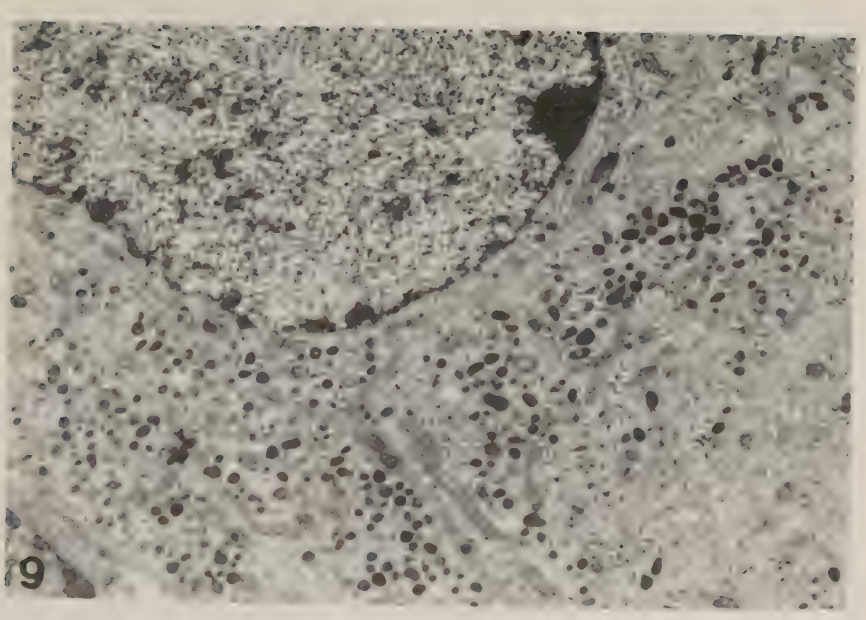


Abb. 8: Nervenzellen 8 Wochen nach Transplantation und Applikation von 5-OHDA. Die Zellen zeigen große, chromatinarme Kerne mit z. T. prominenten Nukleolen (N), Nisslschollen und zahlreiche Mitochondrien. Links unten im Bild eine Synapse (die Pfeile weisen auf die synaptischen Membranspezialisierungen hin), die kein 5-OHDA aufgenommen hat und daher höchstwahrscheinlich cholinerg ist. x 7.8oo.


9

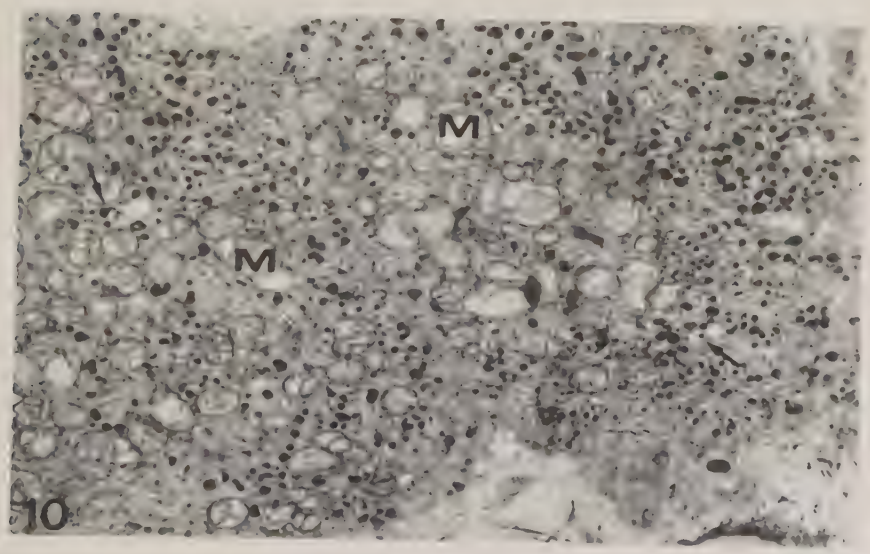
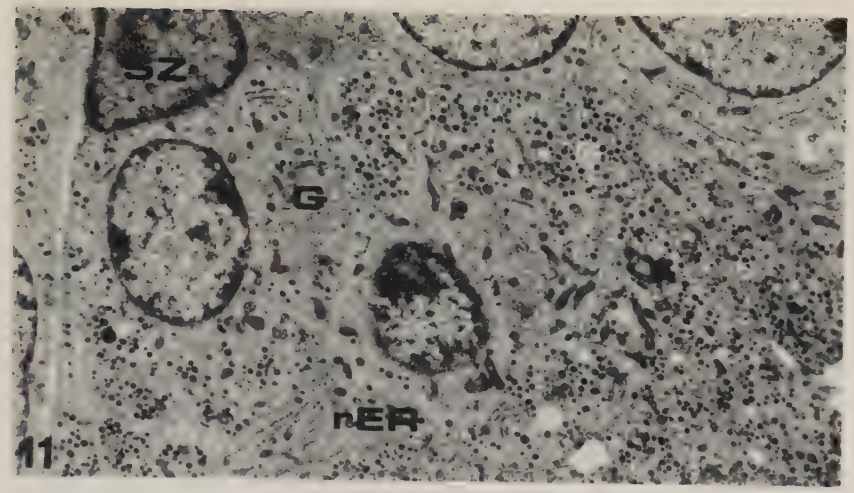

M
M
10

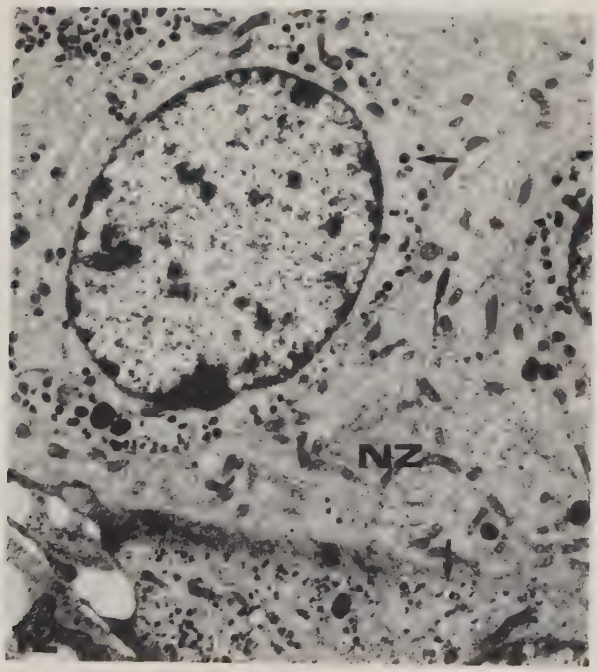
Abb. 9: Adrenale chromaffine Zellen 4 Wochen nach Transplantation und Behandlung mit 6-OHDA. Eine Schädigung der Zellen als Hinweis auf eine intrazelluläre 6-OHDA-Aufnahme ist nicht festzustellen. x 18.000.

Abb. 10: Adrenale chromaffine Zellen 8 Wochen nach Transplantation und 6-OHDA-Behandlung. Die Mitochondrien (M) sind geschwollen. Die "cores" der Speichervesikel weisen eine hohe Elektronendichte auf, sind gelegentlich von einem hellen Hof umgeben und liegen häufig exzentrisch im Vesikel (Pfeile). x 18.000.

Abb. 11: Adrenale chromaffine Zellen 8 Wochen nach der Transplantation. Die Zellen zeigen keine degenerativen Veränderungen und enthalten wie in Kontrollen (vgl. Abb. 1 und 2) Speichervesikel, Golgikomplexe (G) und rauhes ER (rER). Links oben der Kern einer Schwannzelle (SZ). x 7.800.

Abb. 12: Adrenale chromaffine Zellen 8 Wochen nach Transplantation und 5-OHDA-Applikation. Die "cores" der Speichervesikel (Pfeile) sind im Durchschnitt elektronendichter als die nichtbehandelter Tiere und liegen z.T. auch exzentrisch im Vesikel. Nervenzelle (NZ) x 12.000.


SZ
G
nER
11


NZ

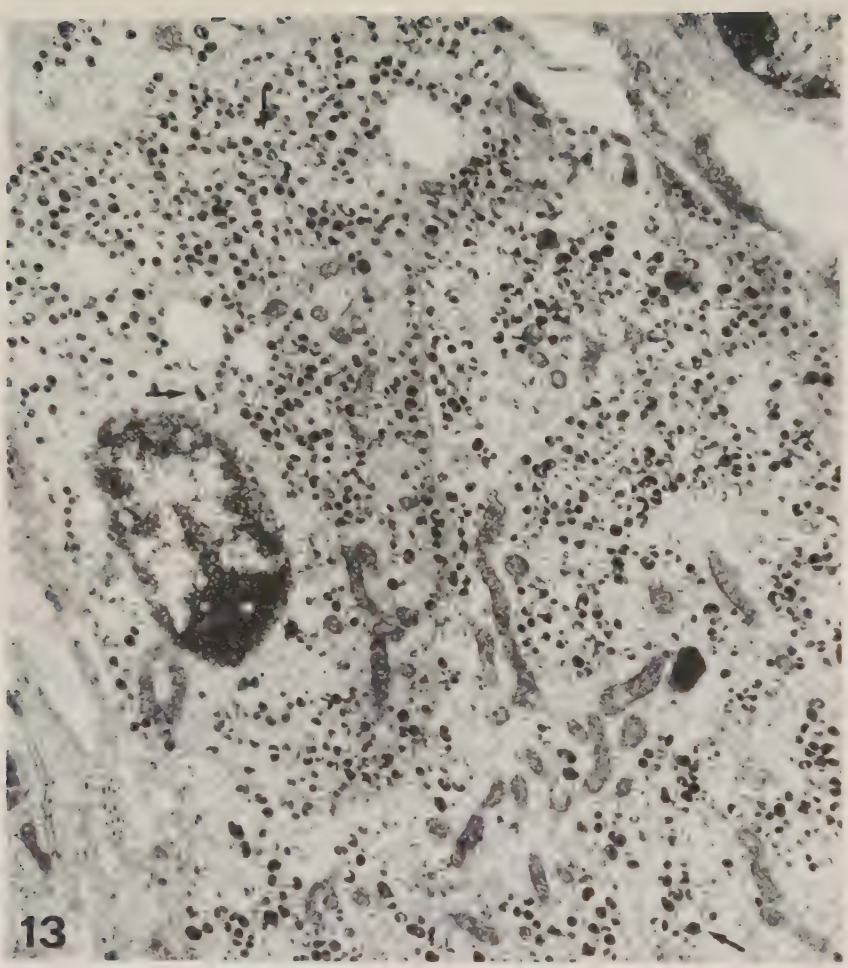


Abb. 13 Adrenale chromaffine Zellen 12 Wochen nach Transplantation und Behandlung mit 5-OHDA. Die 5-OHDA-Aufnahme ist gut zu erkennen an der hohen Elektronendichte und der häufig exzentrischen Lage der "cores" von Speichervesikeln (Pfeile). x 18.000.

Augen übertragen worden waren, unterschieden sich ultramorphologisch nicht von solchen, die in Augen mit intakter sympathischer Innervation implantiert waren.
Nach Verabfolgung des falschen adrenergen Transmitters 5-OHDA waren die chromaffinen Zellen und insbesondere die Speichervesikel unverändert. Auch 6-OHDA bewirkte keine Alteration der chromaffinen Zellen (Abb. 9).

b. nach 8 Wochen

Die Transplantate blieben mit zunehmender Dauer des Aufenthalts in der vorderen Augenkammer morphologisch intakt (Abb. 11). Deutliche Unterschiede gegenüber dem Bild des 4-Wochen-Stadiums waren bei der überwiegenden Zahl der Zellen nicht zu erkennen. Allerdings wiesen die Speichervesikel einiger Zellen nach 5-OHDA "cores" von hoher Elektronendichte auf (Abb. 12). Gaben von 6-OHDA führten in einigen chromaffinen Zellen zur Bildung hoch elektronendichter, weitgehend homogener Einschlußkörper, die von einer Einheitsmembran umschlossen waren, geschwollener Mitochondrien (Abb. 1o) und myelin-ähnlicher Lamellensysteme. Die quantitativen Bestimmungen von A, NA und PNMT ergaben, daß PNMT im Vergleich zum 4-Wochen-Stadium unverändert, A unverändert, NA dagegen deutlich erhöht war. Die Relation der beiden CA betrug annähernd 1:1 (Tab. 1).

c. nach 12 Wochen

In diesem Stadium war eine deutliche Vermehrung von chromaffinen Zellen mit hoher Kern-Cytoplasma-Relation gegenüber dem 4- und 8-Wochen-Stadium zu erkennen.
Die Durchmesser der "dense cores" der Speichervesikel in chromaffinen Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen sowie dem 4- und 8-Wochen-Stadium eine weitere Linksverschiebung (Abb.17).

Etwa jede vierte der chromaffinen Zellen enthielt Speichervesikel mit "cores" hoher und geringer Elektronendichte als möglicher Hinweis auf die Speicherung von primären und sekundären Aminen in derselben Zelle. 5-OHDA verursachte eine Zunahme der Elektronendichte der "cores" in ca. einem Drittel der chromaffinen Zellen (Abb. 13). Die elongierte Form der chromaffinen Zellen mit Übergang in Fortsätze war weit klarer ausgeprägt als im 4- und 8-Wochen-Stadium. Untersuchungen mit 6-OHDA wurden in diesem Stadium nicht durchgeführt.

C. Gewebekulturen

Explantate von NNM neugeborener Meerschweinchen zeigten in der Zellkultur nur einen geringen Auswuchs (Abb.14a), verglichen mit Explantaten, die von 8-14 Tage alten Ratten stammten (Unsicker und Chamley, 1977). Nach 24 bis 36 Stunden waren am Rande der Explantate vereinzelt fibroblastenähnliche und Schwann-Zellen erkennbar. Erst nach 2- bis 4-tägiger Verweildauer der Explantate in der Kultur schoben sich einige schlanke, wenig verzweigte Fortsätze in den "Auswuchs" hinein, die ihrer typischen Wachstumskolben und vereinzelter Varikositäten wegen als neuronale Zellfortsätze gedeutet werden konnten (Abb.14a). In einigen Fällen ließ sich die Kontinuität dieser Fortsätze mit 15-25 µm großen ovalen, am Rande des Explantats gelegenen chromaffinen Zellen feststellen. (Abb. 14b) Nach 4-6 Tagen waren zahlreiche Zellen an den Explantaträndern abgeflacht und aufgrund ihrer dunklen Granulierung als chromaffine Zellen einzuordnen (Abb.15). Nur ein geringer Teil dieser Zellen ließ eine Fortsatzbildung erkennen. Behandlung der Kulturen mit 1o ng/ml NGF führte zu keiner erkennbaren Erhöhung der Zahl und Länge der Fortsätze von chromaffinen Zellen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kulturen nach 8 bzw. 14 Tagen ergaben, daß chromaffine Zellen ultramorphologisch

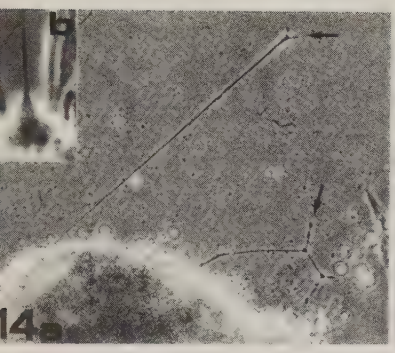


Abb. 14 und 15: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von NNM-Explantaten neugeborener Meerschweinchen in Gewebekulturen.
Abb. 14a: Nach 48-stündigem Aufenthalt in vitro sind aus dem Explantat zwei Fortsätze ausgewachsen, deren Enden typische axonale Wachstumskolben aufweisen (Pfeile). x 8o.

Abb. 14b: Ausschnittvergrößerung einer am Rande eines Explantats gelegenen chromaffinen Zelle mit Fortsatz. x 2oo.

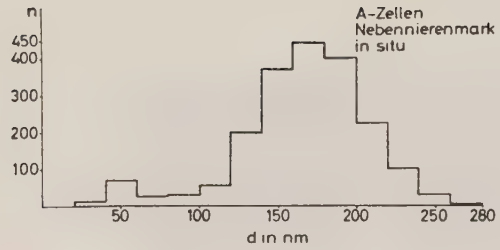
Abb. 15: Abgeflachte chromaffine Zellen am Rande eines 7 Tage alten Explantates zeigen nur eine spärliche Fortsatzbildung (Pfeil). Schwannzelle (sz). x 2oo.

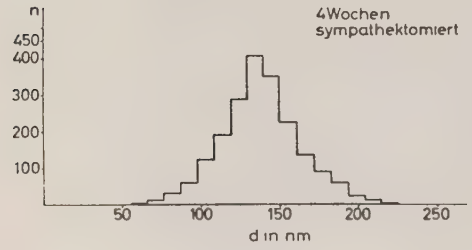
Abb. 16a und b: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer chromaffinen Zelle (Abb. 16a) bzw. von Fortsätzen chromaffiner Zellen (Abb. 16b) nach 8-tägigem Aufenthalt in der Gewebekultur.
Abb. 16a: Chromaffine Zelle mit Fortsatzabgang (Fa), einem gut ausgebildeten Golgikomplex (G) und Speichervesikeln vom A-Typ. Beachte die zahlreichen freien Ribosomen (r) und ER-Profile, Mikrotubuli (t) und membranbegrenzte Einschlußkörper (E). x 24.000.
Abb. 16b: Anschnitte von zwei Fortsätzen chromaffiner Zellen (F) und von zwei Schwannzellen (SZ). Die varikösen Abschnitte der Fortsätze von chromaffinen Zellen enthalten große "chromaffine" Speichervesikel (große Pfeile) und kleine helle Vesikel (kleine Pfeile). Intervarikoser Abschnitt mit Mikrotubuli (t). x 24.000.

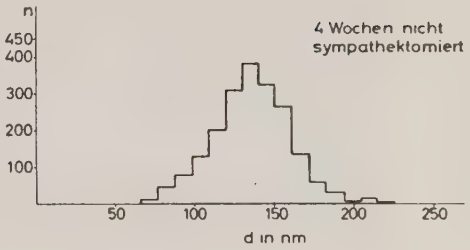
noch deutlich als solche erkennbar waren. Sie enthielten die typischen Speichervesikel, deren Zahl und Größe aber gegenüber den Kontrollen reduziert waren (Abb.16a). Die Durchmesser der "cores" schwankten zwischen 5o und 15o nm. Die meisten Speichervesikel wiesen "cores" geringer bis mittlerer Elektronendichte auf. Die Golgi-Felder waren gut entwickelt und enthielten in Vesikeln und Schläuchen ebenfalls Granula mittlerer Elektronendichte. Stärker als in chromaffinen Zellen in situ traten Mikrotubuli, rauhes ER und Ribosomen hervor. Viele Zellkerne waren eingebuchtet und wiesen große Ansammlungen von randständigem Chromatin auf. Membranumschlossene dichte Einschlußkörper, teilweise mit lamellärer Innenstruktur, waren in großer Zahl in das Cytoplasma eingebettet (Abb.16a).

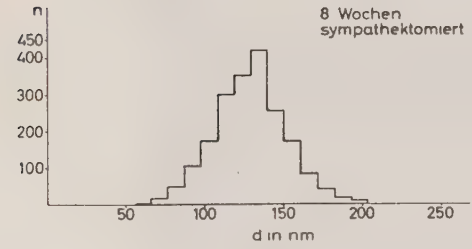
Fortsätze chromaffiner Zellen, die sich in variköse und intervariköse Abschnitte gliederten, lagen sowohl im Innern wie auch im "Auswuchs" der Explantate (Abb.16b).
Varikositäten enthielten kleine, helle Vesikel (Durchmesser 4o-6o nm), die wir in den Perikaryen der chromaffinen Zellen nur sehr selten fanden, sowie große Granulärvesikel, deren "cores" fast ausnahmslos eine geringe bis mittlere Elektronendichte aufwiesen. In intervarikösen Abschnitten dominierten Mikrotubuli und Neurofilamente.

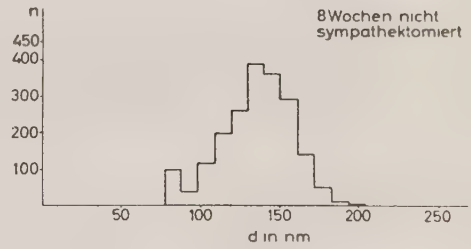
17

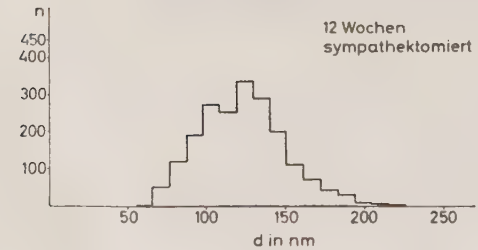












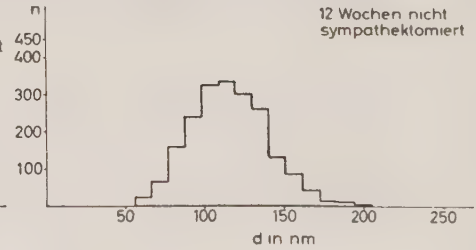


Abb. 17: Histiogramme der Größenverteilung der Kerne von Speichervesikeln in den Zellkörpern adrenaler chromaffiner Zellen 4, 8 und 12 Wochen nach der Transplantation in sympathektomierte bzw. nichtsympathektomierte Augen. Die Kerne der Speichervesikel in transplantierten Zellen sind deutlich kleiner als in Kontrollen. Zwischen sympathektomierten und nicht-sympathektomierten Augen ergeben sich keine auf-

4. DISKUSSION

Transplantationen von NNM in die vordere Augenkammer sind bereits früher mit unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt worden. Coupland (1959), Piezzi u. Cavicchia (1973), Piezzi et al. (1975) sowie Pohorecky und Mitarbeiter (197o) untersuchten Zelltypen und CA-Produktion in Augenkammertransplantaten bei der Ratte morphologisch, histo- und biochemisch und kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während Coupland bis zu 14 Tagen nach der Operation neben NA- zahlreiche A-produzierende Zellen mit Hilfe der Iodat-Reaktion nachweisen konnte, fanden Piezzi et al. in ihren ultrastrukturellen Untersuchungen nach 21 Tagen nur noch sehr wenige Zellen vom A-Typ, ein Befund, der sich mit den von Pohorecky et al. ermittelten stark erniedrigten Werten von A und PNMT in Übereinstimmung bringen läßt. Olson und Malmfors (197o) berichteten, daß transplantierte chromaffine Zellen ihre charakteristische starke CA-spezifische Fluoreszenz beibehalten, CA sezernieren und ähnlich wie adrenerge Neurone Fortsätze ausbilden. In Übereinstimmung mit diesen früheren Untersuchungen können wir bestätigen, daß transplantierte chromaffine Zellen des Meerschweinchens in der vorderen Augenkammer gut überleben und auch in Langzeit-Versuchen studiert werden können. Die vordere Augenkammer besitzt mehrere Vorteile als Transplantationsort:
Es erfolgt nur eine geringe Bindegewebsproliferation bei guter Vaskularisation, das Transplantat ist der direkten Beobachtung zugänglich, das Kammerwasser bietet ein relativ gutes nutritives Milieu und die vordere Augenkammer ist ein immunologisch privilegierter Ort (Woodruff und Woodruff, 195o; Raju und Grogan, 1969; Waltman et al., 1969).
Aufgrund ihrer starken CA-Histofluoreszenz und ihrer Ultrastruktur waren die in die vordere Augenkammer transplantierten chromaffinen Zellen auch nach 12 Wochen eindeutig als solche zu identifizieren.

Ihre spezifischen granulären Speichervesikel ermöglichten die Unterscheidung von den in sehr geringer Zahl vorhandenen Nervenzellen. An den Speichervesikeln fiel auf, daß 1. ihre Zahl in den einzelnen Zellen erheblichen Schwankungen unterworfen war, 2. ihre "cores" durchschnittlich kleiner waren als in Kontrollen und 3. zwar die Mehrzahl der Zellen auch nach 12 Wochen noch Speichervesikel vom A-Typ enthielt, jedoch in mehreren Zellen Speichervesikel mit "cores" hoher Elektronendichte als möglicher Hinweis auf eine Speicherung eines primären Amins (Hopwood, 1971) vorkamen.

Die stark schwankenden Mengen von Speichervesikeln in verschiedenen Zellen reflektieren unterschiedliche Grade der CA-Entspeicherung, die in kausalem Zusammenhang mit den Transplantationsbedingungen stehen müssen, da vergleichbare Bilder in Kontrollen nicht auftraten. Organe, die kurz nach Entnahme und Abpräparieren des Cortex untersucht wurden, zeigten derartige Entspeicherungen ebensowenig wie chromaffine Zellen aus Rinder-NNM kurz nach der Isolierung (Unsicker et al., in Vorbereitung), ein Hinweis darauf, daß diese Entleerung, die als Sekretionsvorgang abgelaufen sein dürfte, erst nach erfolgter Transplantation stattfand. Die Entspeicherung ist keinesfalls das Resultat einer wieder hergestellten cholinergen Innervation (D. Tschechne, in Vorbereitung): Eine positive oder negative Korrelation zwischen entspeicherten und reinnervierten Zellen ließ sich nicht herstellen.

Die "cores" der Speichervesikel transplantierter Zellen waren kleiner als die von chromaffinen A-Zellen in situ. Dieser Befund deckt sich mit den Beschreibungen chromaffiner Zellen in Nierenkapseltransplantaten (Unsicker et al., 1977a, 1978b; Zwarg, in Vorbereitung) und in vitro (Unsicker und Chamley, 1977). Die Ursachen für die Reduzierung der "core"-Durchmesser sind unbekannt. Man kann aber mit Sicherheit sagen, daß es sich hier nicht

um eine Selektion kleingranulärer chromaffiner Zellen, die auch normalerweise im NNM des Meerschweinchens vorkommen (Unsicker et al., 1978a), handelt. Diese kleingranulären Zellen besitzen in der Mehrzahl Speichervesikel vom NA-Typ und haben nur einen 5-1o %igen Anteil an der Gesamtpopulation chromaffiner Zellen, können also nicht identisch sein mit den "kleingranulären" Zellen in Transplantaten.
Kleine Speichervesikel gehören auch zur morphologischen Ausstattung der in zahlreichen sympathischen Ganglien beschriebenen "small granule-containg cells" (vgl. Grillo, 1966; Siegrist et al., 1968; Matthews und Raisman, 1969; Williams und Palay, 1969; Yokota, 1973), die mit den von Erankö und Härkonen (1963), Jacobowitz et al. (197o), und anderen beschriebenen "small intensely fluorescent (SIF) cells" identisch sind. Diese Zellen haben kurze Fortsätze, gehen manchmal Synapsen mit den sympathischen "Haupt"-Neuronen ein, die teilweise am Zellsoma sitzen ("somatic efferent synapses") und werden als Modulatoren der synaptischen Transmission in sympathischen Ganglien diskutiert, welche die inhibitorischen postsynaptischen Potentiale verursachen (Libet und Owman, 1974). Wie diese SIF-Zellen bilden chromaffine Zellen in Transplantaten unter die Nierenkapsel (Zwarg, in Vorbereitung) und in die vordere Augenkammer (D. Tschechne, 1978; Unsicker et al., 1978c) Fortsätze und somatische efferente Synapsen aus. Damit nehmen sie eine intermediäre Position zwischen voll differenzierten adrenergen Neuronen und den endokrinen Zellen des NNM ein.

Die Mehrzahl der chromaffinen Zellen aus Meerschweinchen-NNM gehörte auch 12 Wochen nach der Transplantation noch zum A-Typ. Ebenso verhielten sich diese Zellen in Transplantaten unter die Nierenkapsel und in vitro. Piezzi und Cavicchia (1973), Piezzi et al. (1975) sowie Unsicker und Chamley (1977) berichten dagegen nach Untersuchungen an chromaffinen Zellen der Ratte

übereinstimmend, daß nach 21- bzw. 14-tägigem Aufenthalt in der vorderen Augenkammer oder in der Zellkultur nur wenige oder überhaupt keine Zellen vom A-Typ verblieben waren. Ob es in diesen Fällen zu einem selektiven Absterben von A-Zellen oder wegen der drastischen Verminderung der Glucocorticoide und dem damit verbundenen Aktivitätsverlust der PNMT zur Transformation von A- in NA-produzierende Zellen kam, konnten beide Autorengruppen nicht mit Sicherheit feststellen. Unsicker und Chamley (1977) beobachteten jedoch das simultane Vorkommen von A- und NA-spezifischen Speichergranula in derselben Zelle und werteten dies als Hinweis auf eine möglicherweise stattfindende Transformation.

Wenn es bei der Ratte bereits nach relativ kurzer Zeit zum Verlust der A-Zellen kommt, muß natürlich gefragt werden, warum dies beim Meerschweinchen nicht auch der Fall ist. Zunächst ist festzuhalten, daß beim Meerschweinchen in Augenkammertransplantaten ebenfalls eine Tendenz zur Verminderung der A-Synthese zugunsten der NA-Produktion festzustellen ist. Der NA-Anteil in den Transplantaten stieg bis zur 8. Woche auf etwa 5o % der Gesamt-CA bei gleichzeitigem Absinken der PNMT-Aktivität, während A in der intakten Nebenniere einen Anteil von 9o % an den Gesamt-CA hatte. Das morphologische Äquivalent dieser Änderung der A/NA-Ratio in Transplantaten ist in zwei Beobachtungen zu suchen, nämlich dem vermehrten Auftreten von großen, dichtkernigen NA-Speichervesikeln in den Zellkörpern sowie dem zunehmenden Wachstum der Fortsätze von chromaffinen Zellen, die kleine, dichtkernige, wahrscheinlich NA- enthaltende, aber kaum A-Speichervesikel aufwiesen (D. Tschechne, in Vorbereitung).

Trotz der relativen Zunahme von NA kam es nicht zum Verschwinden von chromaffinen A-Zellen in Augenkammertransplantaten beim Meerschweinchen. Erklärt werden kann dies nicht damit, daß die

im Vergleich zur Nebenniere geringen Glucocorticoid-Mengen im strömenden Blut ausreichen, um das Enzym PNMT zu induzieren bzw. seinen Abbau zu verhindern (Ciaranello et al., 1976), da wir sonst in unseren Kulturen von Meerschweinchen-NNM keine A-Zellen hätten finden dürfen. Als Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von chromaffinen Zellen der Ratte und des Meerschweinchens in Augenkammertransplantaten und in vitro könnten aber altersbedingte oder genetisch kontrollierte Unterschiede in der PNMT-Aktivität dienen. Ciaranello und Axelrod (1973) konnten zeigen, daß zwei Untergruppen eines Mäuse-Inzuchtstammes sich hinsichtlich der PNMT-Aktivität der Nebenniere unterschieden, wahrscheinlich bedingt durch Mutation eines Genlocus, der die PNMT-Degradierung kontrolliert.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob hinsichtlich Struktur und Leistung, d.h. der Differenzierung, Unterschiede bestehen zwischen chromaffinen Zellen in Transplantaten unter die Nierenkapsel (Zwarg, in Vorbereitung), die nicht reinnerviert werden, und Transplantaten in die vordere Augenkammer, die Synapsen von cholinergen Nerven des Ciliarganglions erhalten (Unsicker et al., 1978c, D. Tschechne, in Vorbereitung) und zudem von einem dichten Netz adrenerger Fasern aus dem Ganglion cervicale superius umgeben sind. Weder im Hinblick auf Ultrastruktur noch bezüglich des Verhältnisses A/NA in den Transplantaten ergaben sich Anhaltspunkte für derartige Unterschiede. Man könnte dies als Hinweis dafür werten, daß die Differenzierung dieser Zellen in einer Glucocorticoid-armen Umgebung nicht oder nur geringfügig von einer intakten cholinergen Innervation abhängig ist. Einschränkend muß aber festgestellt werden, daß 1. über die Aktivität der cholinergen Synapsen an den transplantierten Zellen nichts gesagt werden kann, und 2. weitere Parameter der Differenzierung, die durch die Enzyme der CA-Synthese gegeben wären,

nicht in die Untersuchung einbezogen worden sind.
5- und 6-OHDA, die sich vom Dopamin durch eine dritte Hydroxylgruppe am Ringsystem unterscheiden und durch den spezifischen Amin-Aufnahmemechanismus in adrenerge Nerven aufgenommen werden (Übersicht bei Thoenen, 1972), haben wir in unserer Arbeit eingesetzt, um eine eventuell stattfindende Aufnahme und damit das Vorliegen eines Amin-Aufnahmemechanismus in transplantierten chromaffinen Zellen nachzuweisen. In chromaffinen Zellen des NNM vom Meerschweinchen in situ fanden sich keine Hinweise für eine Aufnahme von 5- oder 6-OHDA (Unsicker et al., 1978a). Veränderungen in chromaffinen Zellen nach 6-OHDA-Gabe sind aber bei der neugeborenen Ratte beschrieben worden (Unsicker et al., 1976). Ebenso berichteten Heym und Schmidt (1977) über Veränderungen an den Speichervesikeln von kleingranulären Zellen im Ganglion cervicale superius der Ratte nach Gaben von 6-OHDA. 5-OHDA verursachte bei ca. einem Drittel der chromaffinen Zellen in Augenkammer- wie in Nierenkapsel-Transplantaten (Zwarg, in Vorbereitung) Veränderung in der Vesikelstruktur. Die "cores" zeigten die für NA-spezifische Speichervesikel typische intensive Schwärzung als Hinweis auf eine intrazelluläre Aufnahme von 5-OHDA. Nach Applikation von 6-OHDA traten in einigen chromaffinen Zellen vermehrt elektronendichte Einschlußkörper, Lamellensysteme und geschwollene Mitochondrien auf, Veränderungen, wie sie auch für adrenerge Nerven beschrieben worden sind (Tranzer und Thoenen, 1967, 1968; Malmfors und Thoenen, 1971; Kostrizewa und Jacobowitz, 1974). Zwei Möglichkeiten für die Erklärung dieser Veränderungen in transplantierten chromaffinen Zellen bieten sich an: 1. transplantierte chromaffine Zellen nehmen wie adrenerge Neurone 5- und 6-OHDA in ihre Fortsätze auf und transportieren es retrograd in die Zellkörper; 2. transplantierte chromaffine Zellen verhalten sich in Bezug auf ihre Aminaufnahme wie immature chromaffine Zellen im NNM der Ratte (vgl. Unsicker et al., 1976) oder immature

adrenerge Neurone, die gegenüber 6-OHDA auch sensitiver sind als adulte Zellen (Angeletti und Levi-Montalcini, 197o; Eränkö und Eränkö, 1972).

Chromaffine Zellen aus dem NNM neugeborener Meerschweinchen verhielten sich bei unseren Untersuchungen in vitro z.T. anders, als es aufgrund vorangegangener Studien an chromaffinen Zellen 8-14 Tage alter Ratten erwartet werden konnte (Unsicker und Chamley, 1977; Unsicker et al., 1978d). Sie zeigten nur ein spärliches Fortsatzwachstum, das durch NGF nicht beeinflußbar war und wiesen Anzeichen für die Produktion und Speicherung von A auf. Das Persistieren der A-Speicherung ist angesichts des Fehlens von Glucocorticoiden erstaunlich und stützt unsere Ansicht, daß das Enzym PNMT beim Meerschweinchen im Gegensatz zur Ratte stark genetisch beeinflußt wird (s.o.). Die Gründe für das Nicht-Ansprechen des Fortsatzwachstums auf NGF sind unklar und dürfen wohl nicht im Fehlen oder einer verminderten Ansprechbarkeit von NGF-Rezeptoren gesucht werden, da Otten und Mitarbeiter (1977) sowie Otten und Unsicker (nicht publiziert) gezeigt haben, daß selbst adulte chromaffine Zellen verschiedener Säuger-Spezies noch auf NGF-Gaben mit einer Erhöhung der TH-Aktivität reagieren. NGF-stimuliertes Fortsatzwachstum bei Nervenzellen ist zurückzuführen auf eine vermehrte Polymeristation der Mikrotubulus-Bausteine (Tubuline) (Levi-Montalcini et al., 1968). Die von uns untersuchten chromaffinen Zellen wiesen große Mengen von Mikrotubuli auf, so daß ein Mangel von Tubulin als Erklärung für mangelndes Fortsatzwachstum nicht wahrscheinlich ist. Dieser Befund ist umso erstaunlicher, als selbst chromaffine Zellen von adulten Tieren in der vorderen Augenkammer ein starkes Wachstum von Axonen zeigen (Unsicker et al., 1978c; D. Tschechne, in Vorbereitung) und legt die Vermutung nahe, daß Fortsatzwachstum adrenerger neuronaler Zellen auch durch andere Faktoren als NGF gesteuert werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Adrenale chromaffine Zellen (ACZ) adulter bzw. neugeborener Meerschweinchen wurden 4, 8 und 12 Wochen nach Transplantation in die vordere Augenkammer bzw. 7 und 14 Tage nach Explantation in die Gewebekultur elektronenmikroskopisch, histo- und biochemisch untersucht. Transplantierte ACZ bildeten in der sympathisch denervierten Iris ein dichtes Netz neuronaler, variköser Zellfortsätze und wurden cholinerg - wahrscheinlich von Axonen aus dem Ganglion ciliare - reinnerviert. Das Schwergewicht der vorliegenden Arbeit lag auf der ultramorphologischen Untersuchung der Zellkörper von transplantierten ACZ. Diese speicherten in unterschiedlichen Mengen die für chromaffine Zellen typischen Granulärvesikel, die zwar kleiner waren als in Kontrollen, jedoch wie im Nebennierenmark des Meerschweinchens in situ fast ausschließlich Kerne geringer bis mittlerer Elektronendichte aufwiesen und daher mit großer Wahrscheinlichkeit Adrenalin (A) enthielten. Mit zunehmender Verweildauer der Transplantate in der vorderen Augenkammer entstanden vermehrt Granulärvesikel, die hoch elektronendichtes Material als möglicher Hinweis auf die Speicherung eines primären Amins enthielten.

In den Golgiregionen von ACZ, in denen normalerweise die Neubildung von Speichergranula erfolgt, waren auch 12 Wochen nach der Transplantation noch Granulärvesikel zu erkennen.

Die quantitativen Bestimmungen von A und Noradrenalin (NA) sowie der Aktivität des NA in A überführenden Enzyms Phenyläthanolamin N-methyltransferase (PNMT) in den Transplantaten ergaben, daß bei gegenüber Kontrollen stark reduzierten Werte für die Gesamtcatecholamine das Verhältnis A : NA nach 4 Wochen noch annähernd den Kontrollen entsprach, obwohl die PNMT erheblich reduziert war. Nach 8 Wochen wurden A und NA im Verhältnis von ca. 1 : 1 gefunden.

ACZ in der Gewebekultur zeigten nur ein spärliches Auswachsen von Fortsätzen, das sich auch durch Zugabe von 10 ng/ml eines Nervenwachstumsfaktors (NGF) nicht steigern ließ. Wie in Augenkammertransplantaten bildeten die Zellen Speichergranula vom A-Typ.

Die an ACZ des Meerschweinchens erhobenen Befunde werden kritisch diskutiert und mit bei der Ratte erzielten Ergebnissen verglichen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANGELETTI, P.U., LEVI-MONTALCINI, R.:
Sympathetic nerve cell destruction in newborn mammals by 6-hydroxydopamine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 114-121 (197o)

AXELROD, J.: Purification and properties of phenylethanolamine N-methyltransferase, J. biol. Chem. 237, 1657-166o (1962)

BURNSTOCK, G., EVANS, B., GANNON, B.J., HEATH, J., JAMES, V.:
A new method for destroying adrenergic nerves in adult animals using guanethidine.
Brit. J. Pharmac. 43, 295-3O1 (1971)

BURNSTOCK, G., COSTA, M.:
Adrenergic neurons. London: Chapman and Hall, 1975

CARRUBA, M., CECCARELLI, B., CLEMENTI, F., MANTEGAZZA, P.:
Selectivity in the reinnervation of iris and adrenal medulla by superior cervical ganglion after transplantation under the kidney capsule.
Brain Res. 77, 39-53 (1974)

CIARANELLO, R.D., AXELROD, J.:
Genetically controlled alteration in the rate of degradation of phenylethanolamine N-methyltransferase.
J. biol. Chem. 248, 5616-5623 (1973)

CIARANELLO, R.D., WOOTEN, G.F., AXELROD, J.:
Regulation of rat adrenal dopamine ß-hydroxylase. II. Receptor interaction in the regulation of enzyme synthesis and degradation.
Brain Res. 113, 349-362 (1976)

CHAMLEY, J.H.; MARK, G.E., CAMPBELL, G.R., BURNSTOCK, G.:
Sympathetic ganglia in culture.I. Neurons.
Z. Zellforsch. 135, 287-314 (1972)

CHEAH, T.B., GEFFEN, L.B., JARROTT, B., OSTBERG, A.:
Action of 6-hydroxydopamine on lamb sympathetic ganglia, vas deferens and adrenal medulla: a combined histochemical, ultrastructural and biochemic comparison with the effects of reserpine.
Brit. J. Pharmac. 42, 543-557 (1971)

COUPLAND, R.E.: Synthesis and storage of pressor amines in adrenal medullary grafts.
J. Endocrin. 18, 162-164 (1959)

COUPLAND, R.E.: Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla.
J. Anat. 99, 255-272 (1965)

DOUGLAS, W.W.: Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells.
Brit. J. Pharmac. 34, 451-474 (1968)

ERÄNKÖ, L., ERÄNKÖ, O.:
Effect of 6-hydroxydopamine on the ganglion cells and the small intensely fluorescent cells in the superior cervical ganglion of the rat.
Acta physiol. scand. 84, 115-124 (1972)

ERÄNKÖ, O., HÄRKONEN, M.:
Histochemical demonstration of fluorogenic amines in the cytoplasm of sympathetic ganglion cells of the rat.
Acta physiol. scand. 58, 285-286 (1963)

EULER, U.S.v.: Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. T he effect of drugs.
In: Catecholamines, Hdbk. of Exp. Pharmacology, Vol. XXXIII.(H. Blaschko and E. Muscholl, eds.) Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1972

FELDBERG, W., MINZ, B., TSUDZIMURA, H.:
The mechanism of the nervous discharge of adrenaline.
J. Physiol. (Lond.) 81, 286-3o4 (1934)

FURNESS, J.B., COSTA, M.:
The use of glyoxylic acid for the fluorescence histochemical demonstration of peripheral stores of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in whole mounts.
Histochemistry 41, 335-352 (1975)

GORGAS, K., BÖCK, P.:
Identification of chromaffin and enterochromaffin cells in semithin sections by means of the argentaffin reaction.
Mikroskopie 32, 57-63 (1976)

GRILLO, M.A.: Electron microscopy of sympathetic tissues.
Pharmacol. Rev., 18, 387-399 (1966)

HABURA-FLÜH, O.: Ultramorphologische, histo- und biochemische Untersuchungen am Nebennierenmark des Meerschweinchens unter besonderer Berücksichtigung der kleingranulären Zellen.
Dissertation Fachbereich Medizin der Christian-Albrechts-Universität Kiel. In Vorbereitung

HENDRY, I.A.: Control in the development of the vertebrate sympathetic nervons system. In: Rev. of Neurosci., Vol. 2 (I. Kopin, ed.), pp 149-194
New York: Raven Press 1976

HEYM, CH., SCHMID, M.:
Die paraganglionären Zellen im Ganglion cervicale superius der Ratte nach 6-OH-Dopamin.
Vers. Anat. Ges. 71, 1045-1053 (1977)

HOPWOOD, D.: The histochemistry and electron histochemistry of chromaffin tissue.
Progr. Histochem. Cytochem. 3/1 (1971)

JACOBOWITZ, D.: Catecholamine fluorescence studies of adrenergic neurons and chromaffin cells in sympathetic ganglia. Fed. Proc. 29, 1929 (197o)

KOSTRIZEWA, R.M., JACOBOWITZ, D.M.:
Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. Pharmacol. Rev. 26, 199-288 (1974)

LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P.U.:
Immunosympathectomy. Pharmacol. Rev. 18, 619-628 (1966)

LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P.U.:
Nerve growth factor. Physiol. Rev. 48, 534-569 (1968)

LEVI-MONTALCINI, R., CARAMIA, F., LUSE, A., ANGELETTI, P.U.:
In vitro effects of the nerve growth factor on the fine structure of the sensory nerve cells. Brain Res. 8, 347-362 (1968)

LIBET, B., OWMAN, A.:
Concomitant changes in formaldehyde - induced fluorescence of dopamine interneurons and in slow inhibitory post synaptic potentials of the rabbit superior cervical ganglion induced by stimulation of the preganglionic nerve or by a muscarine agent. J. Physiol. (Lond.) 237, 635-662 (1974)

MAINS, R.E., PATTERSON, P.H.:
Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties.
J. Cell Biol. 59, 329-345 (1973)

MALMFORS, T., THOENEN, H.:
6-hydroxydopamine and catecholamine neurons.
T. Malmfors and H. Thoenen, eds., Amsterdam, London: North-Holland Publ. Co. 1971

MATTHEWS, M.R., RAISMAN, G.:
The ultrastructure and somatic efferent synapses of small granule-containing cells in the superior cervical ganglion.
J. Anat. (Lond.) 1o5, 255-282 (1969)

O'LAGUE, P.H., MacLEISH, P.R., NURSE, C.A., CLAUDE, P., FURSHPAN, E.J., POTTER, D.D.:
Physiological and morphological studies on developing sympathetic neurons in dissociated cell culture.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 4o, 399-4o7 (1975)

OLSON, L.:
Fluorescence histochemical evidence for axonal growth and secretion from transplanted adrenal medullary tissue.
Histochemie 22, 1-7 (197o)

OLSON, L., MALMFORS, T.:
Growth characteristics of adrenergic nerves in the adult rat.
Acta physiol. scand. Suppl. 348, 1-112 (197o)

OTTEN, U., SCHWAB, M., GAGNON, C., THOENEN, H.:
Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine ß-hydroxylase by nerve growth factor: Comparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats.
Brain Res. 133, 291-3o3 (1977)

PATTERSON, P.H.: Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions. Ann. Rev. Neurosci. I, 1-17 (1978)

PATTERSON, P.H., CHUN, L.L.Y.:
The influence of nonneuronal cells on catecholamine and acetylcholine synthesis and accumulation in cultures of dissociated sympathetic neurons.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 36o7-361o (1974)

PATTERSON, P.H., REICHARDT, L.F., CHUN, L.L.Y.:
Biochemical studies on the development of primary sympathetic neurons in cell culture.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 4o, 389-397 (1975)

PIEZZI, P.S., CAVICCHIA, J.C.:
Explants of rat adrenal medulla.
A light and electron microscopic study.
Anat. Rec. 175, 77-86 (1973)

PIEZZI, R.S., POHORECKY, L.A., CAVICCHIA, J.C., GALLEANO, J.P.
Comparative effect of insuline on explants of adrenal medullary tissue and rat adrenal medulla in situ.
J. Endocr. 64, 323-328 (1975)

POHORECKY, L.A., PIEZZI, R.S., WURTMAN, R.J.:
Steroid induction of phenylethanolamine-N-methyl transferase in adrenomedullary explants: Independence of adrenal innervation.
Endocr. 86, 1466-1468 (197o)

POHORECKY, L.A., WURTMAN, R.J.:
Adrenocortical control of epinephrine synthesis.
Pharmacol. Rev. 23, 1-35 (1971)

RAJU, S., GROGAN, J.B.:
Allograft implants in the anterior chamber of the eye of the rabbit. Transplantation 7, 475-483 (1969)

REYNOLDS, E.S.L.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 2O8-213 (1963)

RICHARDSON, K.C., JARRET, L., FINKE, E.H.:
Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy.
Stain Technol. 35, 313-323 (196o)

SIEGRIST, G., DOLVIO, M., DUNANT, Y., FOROGLOU-KERAMEUS, C., de RIBEAUPIERRE, FR., ROUILLER, CH.:
Ultrastructure and function of the chromaffin cells in the superior cervical ganglion of the rat. J. Ultrastruct. Res. 25, 381-407 (1968)

SINGH, J.: A modification of the Masson-Hamperl method for staining of argentaffin cells. Anat. Anz. 115, 81-82 (1964)

SMITH, A.D., WINKLER, H.:
Fundamental mechanisms in the release of catecholamines. In: Catecholamines, Hdbk. of Exp. Pharmacology, Vol. XXXIII. (H. Blaschko and E. Muscholl, eds.) Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1972

STJÄRNE, L.: The synthesis, uptake and storage of catecholamines in the adrenal medulla. The effect of drugs. In: Catecholamines, Hdbk. of Exp. Pharmacol., Vol. XXXIII,(H. Blaschko and E. Muscholl, eds.) Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1972

THOENEN, H.: Surgical, immunological and chemical sympathectomy. In: Catecholamines, Hdbk. of Exp. Pharmacol. Vol. XXXIII,(H. Blaschko and E. Muscholl, eds) Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1972

THOENEN, H.: Transsynaptic enzyme induction. Life Sci. 14, 223-235 (1974)

TORRE, J.C., de la, SURGEON, J.W.:
A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique. The SPG method. Histochemistry 49, 81-93 (1976)

TRANZER, J.P., THOENEN, H.:
Ultramorphologische Veränderungen der sympathischen Nervenendigungen der Katze nach Vorbehandlung mit 5- und 6-Hydroxy-Dopamin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmakol. 257, 343-344 (1967)

TRANZER, J.P., THOENEN, H.:
An electron microscopic study of selective acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. Experientia (Basel) 24, 155-156 (1968)

TSCHECHNE, D.: Neuronale Transformation und Reinnervation von adrenalen chromaffinen Zellen in Transplantaten in der vorderen Augenkammer des Meerschweinchens. Dissertation Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, in Vorbereitung.

UNSICKER, K., ALLAN, I.J., NEWGREEN, D.:
Extraneuronal Effects of 6-hydroxydopamine and extraneuronal uptake of noradrenaline. Cell. Tiss. Res. 173, 45-69 (1976)

UNSICKER, K., CHAMLEY, J.H.:
Effects of dbcAMP and theophylline on rat adrenal medulla grown in tissue culture.
Histochemistry 46, 197-2o1 (1976)

UNSICKER, K., CHAMLEY, J.H.:
Growth characteristics of postnatal rat adrenal medulla in culture.
Cell Tiss. Res. 177, 247-268 (1977)

UNSICKER, K., ZWARG, U., HABURA, O :
Electron microcopic evidence for the formation of synapses and synaptoid contacts in adrenal medullary grafts.
Brain Res. 12o, 533-539 (1977a)

UNSICKER, K., POLONIUS, T., LINDMAR, R., LÖFFELHOLZ, K., WOLF, U.:
Catecholamines and 5-hydroxytryptamine in corpuscles of Stannius of the Salmonid Salmo irideus L.
A study correlating electron microscopical, histochemical and chemical findings.
Gen. Comparative Endocrinol. 31, 121-132 (1977b)

UNSICKER, K., HABURA-FLÜH, O., ZWARG, U.:
Different types of small granule-containing cells and neurons in the guinea-pig adrenal medulla.
Cell Tiss. Res. 189, 1o9-13o (1978a)

UNSICKER, K., HABURA-FLÜH, O., ZWARG, U., TSCHECHNE, B., TSCHECHNE, D.: Interactions between autonomic nerves and adrenal chromaffin cells in culture and in two in vivo transplant systems. In: Peripheral neuroendocrine interaction, R.E. Coupland, W.G. Forssmann, eds., pp 60-69, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1978b

UNSICKER, K., TSCHECHNE, B., TSCHECHNE, D.: Formation of cholinergic synapses on adrenal chromaffin cells in anterior eye chamber transplants. Brain Res. 152, 334-340 (1978c)

UNSICKER, K., KRISCH, B., OTTEN, U., THOENEN, H.: Nerve growth factor induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3498-3502 (1978d)

UNSICKER, K., GRIESSER, H., LINDMAR, R., LÖFFELHOLZ, K., WOLF, U.: Bovine adrenal chromaffin cells in culture. (in Vorbereitung)

WALICKE, P.A., CAMPENOT, R.B., PATTERSON, P.H.: Determination of transmitter function by neuronal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5767-5771 (1977)

WALTMAN, S.R., BURDE, R.M., FAULKNER, H.W.: The ocular immune response II. Immune rejection of penetrating corneal homografts. Early versus late treatment with antilymphocyte serum. Transplantation 8, 147-151 (1969)

WESTON, J.A. The migration and differentiation of neural crest cells.
Adv. Morphol. 8, 41-114 (1970)

WILLIAMS, T.H., PALAY, S.L.:
Ultrastructure of the small neurons in the superior cervical ganglion.
Brain Res. 15, 17-34 (1969)

WOODRUFF, M.F.Q., WOODRUFF, H.G.:
The transplantation of normal tissues with special reference to auto- and homotransplants of thyroid and spleen in the anterior chamber of the eye, and subcutaneously, in guinea pig.
Phil. Trans. Roy. Soc. (Lond.) 234, 559-582 (1950)

WURTMAN, R.J., AXELROD, J.:
Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids.
J. biol. Chem. 241, 2301 (1966)

YOKOTA, R.: The granule containing cell somata in the superior cervical ganglion of the rat as studied by a serial sampling method for electron microscopy.
Z. Zellforsch. 141, 331-345 (1973)

ZWARG, U.: Chromaffine Zellen aus dem Nebennierenmark des Meerschweinchens in Transplantaten unter die Nierenkapsel.
Dissertation Fachbereich Medizin der Universität Kiel, in Vorbereitung

Herrn Prof. Dr. H. Leonhardt und Herrn Prof. Dr. K. Unsicker danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an den Anatomischen Instituten Kiel und Marburg.

Besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. K. Unsicker für seine vielfältige Kritik und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Löffelholz, Frau Dr. Lindmar und Fräulein Wolf, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, verdanke ich die Durchführung der quantitativen Catecholamin- und Enzymbestimmungen.

Mein Dank gilt ferner Frau König, Frau Waluk, Herrn Mrohs und Frau Fischer an den Anatomischen Instituten Kiel und Marburg für technische Hilfen.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"Ultramorphologische, histo- und biochemische Untersuchungen zur Differenzierung adrenaler chromaffiner Zellen des Meerschweinchens in Transplantaten in die vordere Augenkammer und in der Gewebekultur"

in den Anatomischen Instituten Marburg und Kiel unter Leitung der Herren Prof. Dr. K. Unsicker und Prof. Dr. H. Leonhardt mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. K. Unsicker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

LEBENSLAUF

Am 17. Juni 1952 wurde ich als Tochter des Zahnarztes Dr. Winfried Gieshoff und seiner Ehefrau, der Musiklehrerin Maria Gieshoff geb. Strauchen, in Dülken geboren und römisch-katholisch getauft.

Von 1958 bis 1962 war ich Schülerin der katholischen Südschule zu Dülken und besuchte ab 1962 das Städtische Mädchengymnasium in Viersen. Am 15. Juni 197o legte ich dort meine Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 197o/71 studierte ich Medizin an der Rijksuniversiteit Gent (Belgien).

Zum Sommersemester 1971 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel. Nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung im März 1972 legte ich im April 1974 das Physikum an der hiesigen Universität ab. Am 2. Dezember 1976 beendete ich mein zahnmedizinisches Staatsexamen und erhielt am 9. Dezember 1976 die Bestallung als Zahnärztin.

Seit Januar 1977 bin ich mit dem Zahnarzt Dietrich Tschechne verheiratet.

Ebenfalls im Januar 1977 begann ich die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel. Seit Oktober 1977 arbeite ich als Assistentin in einer zahnärztlichen Praxis in Neumünster.

Zur Beachtung bei den Vergrößerungsmaßstäben der Abbildungen:
Bei der Drucklegung sind alle Photographien um 30 % verkleinert worden.